

### REMARKS

In this Amendment, Applicant has amended Claims 19 and 25 to further specify the invention and overcome the rejections. It is respectfully submitted that no new matter has been introduced by the amended claims. All claims are now present for examination and favorable reconsideration is respectfully requested in view of the preceding amendments and the following comments.

---

#### REJECTIONS UNDER 35 U.S.C. § 112:

Claims 19-31 have been rejected under 35 U.S.C. § 112, second paragraph, as allegedly being indefinite for failing to particularly point out and distinctly claim the subject matter which Applicant regards as the invention. Applicant traverses the rejection.

It is respectfully submitted that in view of presently claimed invention, the rejection has been overcome. In particular, Applicant respectfully submits that "linking agent" in the field of the present invention is well understood by a person of ordinary skill in the art. A compound may be used as a linking agent, i.e. as a chemical bridge, if it has a small size molecule and retains one or more groups capable of reacting with an enzyme. Applicant preferably uses glutarite dialdehyde as a linking agent. It is also known that cyanuric chloride (trichlorotriazine) and others can be used as linking agents (See attached article in Russia (English translation will be provided in a supplemental response): Immobilized Enzymes: An Introduction and Applications in Biotechnology. Michael D. TREVAN, Senior Lecture in Biotechnology, The Hatfield Polytechnic, John Wiley & Sons Chichester · New York · Brisbane · Toronto). Moreover, Claim 19 further specifies the mass % amounts of linking agent, insulin and erythrocytes. Please note that the previously presented Claim 19 uses proportion measurement. In this amendment, Applicant uses mass % measurement. Except for the different ways of measurement, there is no change in the amounts of different ingredients. In addition, Claim 25 has been

rephrased to specify that the linking agent is glutarite dialdehyde. By this amendment, all other claims also overcome this rejection due to their dependency on Claims 19 and 25. Accordingly, withdrawal of the rejection under 35 U.S.C. § 112 is respectfully requested.

REJECTIONS UNDER 35 U.S.C. § 103:

Claims 19 – 31 have been rejected under 35 U.S.C. § 103, as allegedly being obvious and unpatentable over Morenkova (Derwent abstract, ACC-NO: 1997-041104) in view of Cho et al.(US5,665,700). The Examiner points out in the office action that, given the publication of Morenkova, the present invention only differs in the use of another amount of the linking agent, 0.05-0.15%, which reduced toxicity of the medicine. The Examiner believes that the above effect obtained is obvious to a person skilled in the art. Applicant traverses the rejection.

Although it is known that reducing the amount of a linking agent results in reduction of the medicine toxicity. It is, however, not obvious for one skilled in the art at all whether the reduction of the linking agent, in particular glutarite dialdehyde, would also result in the deterioration of the medicine quality. More specifically, it is not obvious whether an increased content of glucose in blood will occur after using the medicine with reduced linking agent comparing to using the medicine with higher level linking agent. All previous experiments attested to the contrary – it was not possible to further reduce the amount of linking agent as it would lead to a dramatic deterioration of the quality of the medicine. For example, in Morenkova, glutarite dialdehyde is not decreased below 0.15% in the final concentration. However, after Applicant carried out additional research in the present invention, Applicant unexpectedly discovered the presently claimed medicine having insulin, erythrocytes and a linking agent within the specified mass % without deterioration of its main function as an insulin-containing medicine. Therefore, it is not obvious to a person of ordinary skill in the art to discern the present invention.

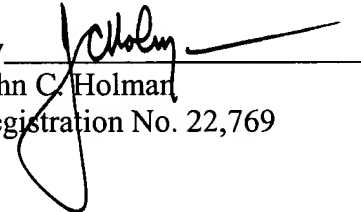
In summary, neither Morenkova nor Cho et al. have suggestion or incentive to combine these two references together to achieve the present invention. Even if combined, Morenkova and Cho et al. do not teach or suggest the present invention as in the Claims 19 – 31. Accordingly, Applicant respectfully requests that the rejection under 35 U.S.C. §103 be withdrawn.

Having overcome all outstanding grounds of rejection, the application is now in condition for allowance, and prompt action toward that end is respectfully solicited.

Respectfully submitted,

JACOBSON HOLMAN PLLC

Date: September 30, 2003  
(202) 638-6666  
400 Seventh Street, N.W.  
Washington, D.C. 20004  
JCH/jc  
Atty. Dkt. No.: P67002US0

By   
John C. Holman  
Registration No. 22,769

US01-1N/458

# Immobilized Enzymes

An Introduction and Applications  
in Biotechnology

Michael D. TREVAN

Senior Lecturer in Biochemistry  
The Hatfield Polytechnic

John Wiley & Sons  
Chichester · New York · Brisbane · Toronto

М.ТРИВЕН

# ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

ВВОДНЫЙ КУРС И ПРИМЕНЕНИЕ  
В БИОТЕХНОЛОГИИ

Перевод с английского

канд. биол. наук Е. Б. МАЯЗЕЛЯ

под редакцией

чл.-корр. АН СССР И. В. БЕРЕЗИНА

Москва  
«Мир»  
1983

16

Г. Лавра

шее изучение производных целлюлозы в качестве носителей для ферментов. Непременная популярность целлюлозы обусловлена присущими ей ценными свойствами: высокой гидрофильностью, доступностью, способностью образовывать различные производные и леткостью, с которой основанные на целлюлозе полимеры можно получать либо в виде порошков, либо в виде тонких пленок. Так, Митч и Суммарна опубликовали в 1961 г. методы присоединения триптана и хлоротриптана к диазолированной *p*-аминобензоилцеллюлозе и к глицеридному производному карбоксиметилцеллюлозы. Оба этих метода используются и сейчас.

### 3. Связывающие молекулы

При использовании в качестве полимерного носителя целлюлозы более целесообразно не присоединять к ней реакционноспособную группу (как в случае *p*-аминобензоилцеллюлозы), а связывать молекулы целлюлозы и фермента с помощью какого-либо химического «мостика». Молекула, выполняющая роль мостика, должна иметь небольшие размеры, и после присоединения к целлюлозе у нее должна сохраниться еще одна группа, способная вступать в реакцию с ферментом. Этим требованиям удовлетворяет, например, хлористый цианур (трихлортриазин), обладающий тремя реакционноспособными связями C—Cl (рис. 3). Одна из них сначала очень быстро взаимодействует с целлюлозой, вторая реагирует с ферментом, а третья — с любой другой подходящим соединением. С помощью этого метода Кэй и его сотрудники [25, 27] присоединили к целлюлозе (в виде фильтровальной бумаги) тапактозидазу, лактатдегидрогеназу, пируваткиназу и креатинкиназу. Особое достоинство хлористого цианура в роли шпильки состоит в том, что ионные свойства комплекса фермент—целлюлоза зависят от заряда сшивающей молекулы. Он может быть нейтральным, отрицательным или положительным в зависимости от природы вещества, присоединяемого третьей связью C—Cl. Поэтому данный метод позволяет получать функциональные фермент-целлюлозные комплексы, что очень существенно, так как при использовании

Методы иммобилизации

17

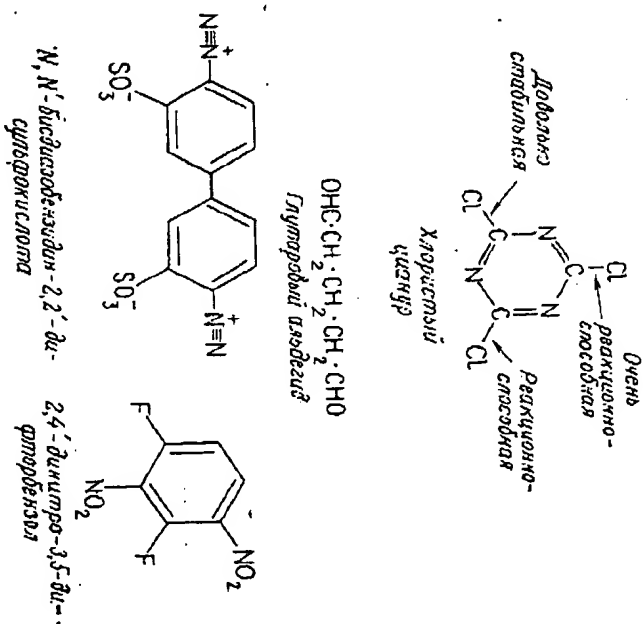


Рис. 3. Многофункциональные реагенты.

большинства других методов образуются полианонные комплексы.

Другое соединение, нашедшее широкое применение в качестве мостика, — это глицерин, содержащий две альдегидные группы на обоих концах цепи (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Эти группы при нейтральных значениях pH реагируют со свободными аминогруппами. Таким образом, один конец молекулы глицерина альдегида может быть присоединен к носителю, а другой — к ферменту.

Наиболее распространенный в настоящее время способ активации носителя связан с использованием бромистого циана (CNBr) [5, 37]. Точный механизм взаимодействия этого соединения с целлюлозой еще предстоит выяснить, однако установлено, что при высоких значениях pH CNBr, по-видимому, легко взаимодействует с гидроксильными группами полисахаридов, а образо-

вавшееся производное в слабощелочном растворе реагирует затем со свободными аминокислотными ферментами. Тем не менее применение этого метода вызывает некоторые затруднения, обусловленные не только необходимостью работать с бромистым цианом, но и тем, что такой способ связывания, особенно небольших молекул, не дает достаточно стабильных производных.

#### 4. Недостатки целлюлозы, ее дериватов

Полисахариды не являются идеальными носителями для иммобилизации ферментов, так как они страдают двумя серьезными недостатками. Во-первых, полисахариды подвержены воздействию микробов. Ничто не вызывает такого сильного отторжения, как вид колонии микробов, жадно поедающих прекрасный препарат иммобилизованного фермента, особенно если это происходит в условиях промышленного производства! Во-вторых, целлюлоза способна неспецифически сорбировать значительные количества белка. А это означает, что по окончании препаративного опыта иммобилизован- ный фермент необходимо тщательно отмыть буфером с высокой ионной силой. Такая процедура при ее проведении в больших масштабах не только дорогостояща, но зачастую приводит и к инактивации фермента, особенно в тех случаях, когда его активная форма представляет собой димер или олигомер (см. гл. 2, разд. II, 1).

Большое число работ было посвящено поискам таких полимерных носителей, которые были бы гидрофильными, но не подвержены воздействию микробов. В 1964 г. Левин и Гольдштейн независимо друг от друга сообщили об использовании в качестве носителя для различных ферментов сополимера этилена и малеинового ангидрида. Среди других материалов успешное применение нашли стекло [17] и пайрон [22]. Более общий подход к созданию носителей разработан Иман и Линч [21], которые в 1969 г. впервые использовали различные производные полиакриламида. В настоящее время в продаже имеется множество различных готовых к употреблению акриловых сополимеров, реакционноспособные группы которых обычно представляют собой диазопроиз-

водные, альдегидные и карбоксиметильные группы, а также производные цианостоводородной кислоты. К полимерам такого типа относятся и часто используемые растворимые производные полиакриловых кислот, пригодные для получения растворимых иммобилизованных ферментов.

### III. Соподимеризация с помощью многофункциональных реагентов

Многофункциональные реагенты можно применять не только для присоединения молекул фермента к целлюлозе или другим полимерам, но и для связывания молекул фермента друг с другом. Хотя такая матрица может содержать только одну молекулу фермента, с экономической точки зрения обычно более целесообразно получать сополимеры фермента с инертным белком, например с альбумином, чтобы увеличить объем конечного продукта.

К наиболее широко используемым многофункциональным реагентам относятся глутаровый альдегид. Альдегиды вообще и глутаровый альдегид в особенности давно применяются в качестве фиксаторов реактивов. Телескопическое действие альдегидов на белки было отмечено Баккером еще в 1910 г. По существу, это старое наблюдение не утратило своего значения и сегодня. С помощью глутарового альдегида исключительно трудно осадить из раствора белковую матрицу, в лучшем случае раствор превращается в гель. Для того чтобы получить нерастворимую матрицу, состоящую из фермента и глутарового альдегида, необходимо либо заполнить глутаровый альдегид, либо осадить фермент (или адсорбировать его на поверхности какого-либо нерастворимого носителя). В результате увеличивается длина связывающей молекулы или уменьшается расстояние между молекулами фермента. Воспользовавшись таким подходом, Ричардс [39], Огата [35], Йенсен [23] и Хабиб [17] смогли попеременно мостиками и перемычками в нерастворимую форму кристаллическую карбоксиметилцеллюлозу А, субтимизин повов, папаин и трипсин соответственно.

Глутаровый альдегид можно также использовать для приготовления пленок попеременно сшитого фермента с